Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. phil., Dr. med., Dipl. chem.
W. Zimmermann

Wirkungen von Zytostatika auf Blutbild und Plasmasteroide des normalen und splenektomierten Meerschweinchens

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1960

vorgelegt von
Winfried Waider

Dekan: Prof. Dr. med. F. Loew

Referent: Prof. Dr. phil., Dr. med., Dipl. chem.
W. Zimmermann

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. phil., Dr. med., Dipl. chem.
W. Zimmermann

Wirkungen von Zytostatika auf Blutbild und Plasmasteroide des normalen und splenektomierten Meerschweinchens

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Winfried Waider

Dekan: Prof. Dr. med. F. Loew

Referent: Prof. Dr. phil., Dr. med., Dipl. chem.
W. Zimmermann

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche promotionsprüfung wurde am 25. April 1968 abgelegt.

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT GEWIDMET

GLIEDERUNG

1. EINLEITUNG

a) Endoxan

b) Trenimon

2. MATERIAL UND METHODE

3. ERGEBNISSE

4. DISKUSSION

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. VERZEICHNIS DES SCHRIFTTUMS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552721_0067

EINLEITUNG

Unter Zytostatika verstand man zuerst Stoffe, die direkt die Zellteilung besonders bei Tumorzellen verhindern. Heute bezeichnet man damit alle diejenigen hochreaktiven Substanzen, die die Entwicklung und Vermehrung von Zellen mit hoher Proliferationsrate hemmen (56, 57, 58, 124), gleichgültig, ob sie wirklich am Zellteilungsapparat eingreifen oder nicht. Sie beeinflussen die Zellen durch ihr biochemisches Verhalten.

Aufgrund ihres Wirkungscharakters unterscheidet man :

1. Antimetabolite, die, chemisch betrachtet, ihren Metaboliten gleichen, ohne aber deren Funktion zu erfüllen (z.B. Folsäure-, Purin- und Pyrimidinantagonisten).

2. Hormone : z.B. Östrogene bei Prostata-Carcinom oder Androgene bei Mamma-Carcinom.

3. Mitosehemmstoffe wie das Colchizin, Urethan, Arsenik.

4. Antibiotika mit zytostatischer Wirkung wie das Mitomycin, Actinomycin und das Azaserin.

5. Alkylierende Substanzen : z.B. N-Lost und Äthyleniminverbindungen, deren zellschädigende Wirkung darin besteht, daß Alkylreste an Proteine und Nucleinsäuren irreversibel fixiert werden (125). Sie stammen alle vom Senfgas ab, das 1917 als Kampfgas (Gelbkreuz) in Ypern verwendet wurde. Über den primären Angriffspunkt der alkylierenden Stoffe ist trotz zahlreicher Untersuchungen bisher nichts bekannt. (55, 86). Sie ähnelten in ihrer Wirkung den Röntgenstrahlen und wurden zunächst als Radiomimetika bezeichnet, zeigen aber nach neueren Untersuchungen erhebliche qualitative und quantitative Unterschiede zu den ionisierenden Strahlen (2, 12,81).

Wie die Antimetaboliten haben die alkylierenden Zytostatika ihren Angriffspunkt in der Interphase des Zellzyklus (16, 55, 59, 65, 86, 101). Während der letzten Stunden der Interphase (= Arbeitsform der Zelle) kommt es zur Vorbereitung der neuen Mitose. Man nimmt an, daß in dieser "Vorbereitungsphase" (oder Antephase) der Bestand an DNS verdoppelt wird (31).

Die Antimetaboliten sind ähnlich den Sulfonamiden : kompetitive Antagonisten biochemischer Reaktionen. Die Folge ist eine Blockierung der Aminosäure-, Purin- und Pyrimidinsynthese und damit eine Hemmung der Nukleinsäuresynthese.

Anders wirken die alkylierenden Interphasengifte auf die Zelle.

Man unterscheidet drei Gruppen von Substanzen :

a) Lostderivate (z.B. Endoxan^R)

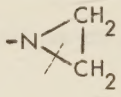
b) Äthylenimine (z.B. Trenimon^R)

c) Dimethansulfonoxyde (z.B. Myleran^R)

Von Interesse sind in diesem Zusammenhang nur die Lostderivate und Äthylenimine. Gemeinsam ist beiden Stoffklassen, daß an bestimmte Grundmoleküle aktivierbare funktionelle Gruppen gekoppelt sind, die in vivo alkylierende Eigenschaften besitzen (58). Aus den Lostverbindungen entsteht durch Dissoziation der Chloratome und aus den Äthyleniminsubstanzen durch Aufspaltung des Ringes in den funktionellen Gruppen im sauren Milieu ein Carbenium-Kation (59):

a) Lostderivate : $>N-CH_2-CH_2-Cl$

b) Äthylenimine :



$\Big\}$ $>N-CH_2-CH_2^+$ Carbenium-Ion

Dieses Ion stellt das eigentlich wirksame Prinzip dar (58). Es reagiert mit Amino-, Carboxyl- und Sulfhydryl-Gruppen der Eiweißkörper und den Phosphatgruppen der Nukleinsäuren (116). Die Folgen sind intra- und intermolekulare Vernetzungen an der DNS (59), die den Hauptbestandteil der Chromosomen darstellt. Bereits Schwellendosen von N-Lost rufen nach Gilman und Philips (zitiert bei 121) an diesen Strukturveränderungen hervor. Die beiden halogenierten Seitenketten des N-Lostes verbinden sich mit den Chromatidfasern und stellen Brückenbildungen her (Cross-linking-Effekt) (zitiert bei 121). So kommt es durch die Loste und Äthylenimine zu Chromosomenbrüchen (1, 10, 62, 80), deren Folgen sich u.a. in mutagenen Wirkungen zeigen (21, 36, 68, 71, 72). Dabei soll Endoxan^R schwächer mutagen als Trenimon^R wirken (59). Die Störungen der DNS-Synthese haben natürlich auch Konsequenzen für die eigentliche Mitose.

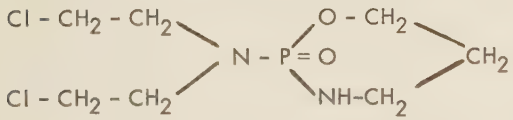
Über den depressorischen Effekt von Endoxan[R] und Trenimon[R] auf das weiße Blutbild berichten Druckrey, Scaltrini u.a. (46, 49, 58, 60, 117, 127).

a) ENDOXAN

v. Meyer hat 1887 zum ersten Male die toxischen Eigenschaften der Loste beschrieben (92). Die Entdeckung der zytostatischen Wirkung von Stickstoff-Lost-Verbindungen geht zurück auf Berenblum (11), Gilman (61) und Goodman (63).

Obwohl die Äthylenimine und die Lostderivate letztlich durch dieselben Radikale schädigend in den Stoffwechsel eingreifen, beruht die Wirkung der letztgenannten Substanzen auf dem von Druckrey und Raabe postulierten Prinzip der Transportform-Wirkform: ein hochaktiver Stoff (= Wirkform) wird durch Koppelung an ein Trägermolekül (= Transportform) inaktiviert und im günstigsten Fall enzymatisch am Wirkungsort aktiviert. Erfolgreich verwirklicht wurde dieses Prinzip zum ersten Male von Druckrey und Raabe in der Therapie des Prostata-Carcinoms (47): die im Prostata-Gewebe reichlich vorhandene saure Phosphatase setzt aus dem unwirksamen Stilboestroldiphosphat (Honvan[R]) das zytostatisch wirkende Stilboestrol frei. In Analogie zu dieser neuen Art der Krebschemotherapie synthetisierten Arnold, Bourseaux und Brock (7, 5, 9) den zyklischen Phosphamidester des bis-ß-chloräthylamins, der unter dem Namen Endoxan[R] in den Handel kam.

Schema für das Prinzip Transportform-Wirkform beim Endoxan[R]:



Wirkgruppe Trägermolekül

Für die Annahme, daß Endoxan[R] dem Transportform-Wirkform-Prinzip folgt, spricht nach Brock und Wilmanns (25) die Inaktivität dieser Substanz in vitro (5) und die starke zytostatische Wirkform in vivo gegenüber zahlreichen Tiertumoren (24, 25, 126). Bolt und Mitarbeiter (18) konnten die Realisation dieses Prinzips

durch Applikation von radioaktiv markiertem Endoxan^{R} am Menschen weiter festigen. In zahlreichen Tierversuchen wurden die therapeutischen Eigenschaften des zyklischen Phosphamidesters untersucht (24, 26, 27), und es ergab sich bei den verschiedenen Impftumoren eine geringe leukotoxische Wirkung bei großer therapeutischer Breite (6, 24).

Die zytostatische Wirksamkeit der N-Lostverbindungen hängt ab von der Ionisation der Chloratome der ß-chloräthyl-Gruppen (8, 23, 66, 104, 115). Ist die Ionisationsgeschwindigkeit groß, so ist die direkte wachstumshemmende Wirkung der Substanz ebenfalls groß; ist sie dagegen klein, so ist der Stoff als inaktiv zu betrachten. Die Chlor-Abspaltung steht wiederum in Korrelation zum basischen Charakter des zentralen N-Atoms. Je schwächer die Basizität, desto langsamer werden die Chloratome, durch die das Molekül alkylierende Eigenschaften (8) erhält, abgespalten (23, 103). Zur Verringerung der Basizität koppelte man an den positiv geladenen Loststickstoff einen elektronegativen Phosphorylrest (4, 34). So entstanden wirksame Verbindungen, unter denen sich das Endoxan^{R} als die in vivo wirksamste Form, entsprechend dem Transportform-Wirkform-Prinzip, erwiesen hat (9, 17, 24, 48, 52). Nach Brock, Hohorst u.a. (28, 29, 30, 52) wird Endoxan^{R}, nicht wie zuerst angenommen, durch Phosphamidasen im Tumor in die aktive Form überführt, sondern bereits in den Lebermikrosomen, aber auch in der Lunge und der Nierenrinde (28) voraktiviert. Das entstandene Zwischenprodukt kann sich wahrscheinlich spontan in die Wirkform umwandeln (30). Sie ruft irreversible chemische Veränderungen an lebenswichtigen Bestandteilen hervor. Besonders betroffen sind:

1. Nukleinsäurestoffwechsel
2. Energiestoffwechsel
3. Fermentsysteme
4. Neurovegetatives System

1. Schädigung der Nukleinsäuresynthese

Wheeler und Mitarbeiter (130) erkannten, daß N-Lost in die Nukleinsäure eingebaut wird und mit den Phosphoryl- und Aminogruppen, ferner auch mit den Hydroxyl-, Purin- und Pyrimidingruppen reagiert.

In Tumorzellen und normalem Gewebe der Ratte sahen Rathgen, Humke und Heinrichs (110) einen verminderten Einbau markierten anorganischen Phosphats in die DNS. Diese Befunde werden von Palme, Liss u.a. (87, 98, 99), die ähnliche Ergebnisse erhielten, im Sinne einer Hemmung der DNS-Biosynthese interpretiert.

N-Lost beeinflußt auch die immunologischen und allergischen Vorgänge des Organismus : kleine Dosen verstärken die Antikörperproduktion, während antimitotische Dosen die Bildung der Antikörper herabsetzen (53). An Hand des Allylalkohol - nekrosetestes an der Rattenleber kommt es zu einer Verminderung der allgemeinen Resistenz durch Endoxan^{R} (50). Auch Henne (69) beschreibt die Hemmung körpereigener Abwehrvorgänge nach Endoxanapplikation.

2. Einfluß auf den Energiestoffwechsel

Im Tumor wird DPN schlecht synthetisiert (107), aber gerade dort infolge des erhöhten Glukoseumsatzes dringend benötigt. Durch Zytostatika (N-Lost und Äthylenimin-verbindungen) kommt es zur Hemmung der Glykolyse der Tumorzellen durch eine weitere Senkung des DPN-Spiegels (76, 113). Nach Meinung amerikanischer Biochemiker (85) allerdings kommt der Glykolysehemmung beim Wirkungsmechanismus cytostatischer Substanzen keinerlei Bedeutung zu und dürfte wahrscheinlich nur als ein sekundärer Vorgang aufzufassen sein (65, 74).

3. Schädigung verschiedener Fermente

Einen Abfall fast aller glykolytischer Fermente, besonders der Phosphoglycerin - aldehyddehydrogenase und Hexokinase, beschreibt Löhr (89). Grella (64) sah eine signifikante Hemmung der Glucose-6-phosphatdehydrogenase nach En - doxan-Aktivierung durch Placenta Homogenat. Die Verminderung des Glykogengehaltes der Leber durch N-oxyd-Lost spricht nach Cardinali und Mitarbeitern (33) für eine fermentative Hemmung der Glykogenese. Unter N-Lost kommt es zu einer irreversiblen Hemmung des Cholinoxydase- und Cholinazetylasesystems (35). Vielleicht wird so die Umwandlung des Cholins in andere Methylakzeptoren (z.B. Methionin) verhindert (128).

Brin und McKee (22) sahen eine Abnahme der Transaminaseaktivität im Rattendünndarm durch N-Lost. Auch wird über die Hemmung der Katalase in vitro berichtet (95).

4. Beeinflussung des neurovegetativen Systems

Boyland und Mitarbeiter (20) betonen die Wirkung des N-Lost auf das ZNS, besonders auf dessen parasympathischen Teil. Es wirkt parasympathicomimetisch (58) und kann bis zu Nausea und Erbrechen führen (123). Lostderivate können sogar durch Stimulation des ZNS bis zu Krämpfen führen (58). Borison u.a. (19) nehmen an, daß diese Substanzen bei der Katze wahrscheinlich am Vorderhirn angreifen.

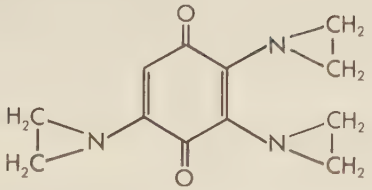
Neben diesen extrahormonalen Wirkungen wird auch über N-Lost als Stressagenten berichtet (53, 123). Faßbender (51) führt die bei Ratten nach einmaliger subletaler Endoxandosis von 150 mg/kg i.p. in den ersten zwei Tagen entstehende Lipoidentspeicherung in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde auf eine Stresssituation zurück, deren Folge eine vermehrte Ausschüttung von Glucocorticoiden der Nebennierenrinde ist.

Über die antiphlogistische Wirkung dieses Zytostatikums berichtete als erster 1952 Aleksandrowicz (3). Da es eine Hyperkorticotropinämie (13, 53) hervorruft mit entsprechender Hyperplasie der Nebennierenrinde (zitiert bei 119), kann man so z.T. die entzündungshemmende Wirkung des N-Lost erklären. Denkbar wäre auch der direkte Angriffspunkt auf die Bindegewebsneubildung (zitiert bei 119).

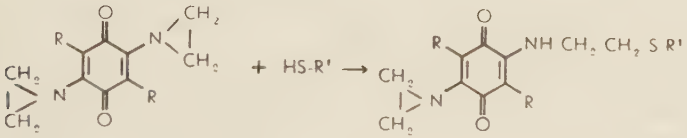
b) TRENIMON

Zu den wirksamsten alkylierenden Zytostatika gehören auch die von Domagk als krebshemmend erkannten Äthyleniminochinone (39, 41, 42). Sie wurden von Gauß und Petersen (54, 100) synthetisiert und von Domagk und Mitarbeitern (40, 42, 44) in die Therapie eingeführt. Trenimon^{R} zeigte sich von allen getesteten Substanzen als das therapeutisch wertvollste Präparat (43). Es ist das 2,3,5 - Tris - äthyleniminobenzochinon- (1,4), eine tiefviolette, wasserlösliche

Substanz von folgender Strukturformel:



Die Äthyleniminochinone (AIC) haben in ihrem Molekül zwei tumorhemmende Prinzipien: die Iminogruppen der alkylierenden Substanzen und den Benzochinonring (79, 108), dessen zytostatische Wirkung bereits 1946 entdeckt wurde (84). Man kann sich die Reaktion dieser Stoffklasse mit leicht alkylierbaren Substanzen nach folgendem Schema vorstellen (107) (HS-R' = SH Gruppen von Fermenten):



Die AIC sind nach Pütter (107, 108) in saurem Milieu besonders aktiv. Deshalb finden sie im Tumorgewebe durch die aerobe Glykolyse der Krebszellen optimale Reaktionsbedingungen.

1. Störungen der Nukleinsäuresynthese

Alle therapeutisch wichtigen alkylierenden Substanzen können mit wenigstens zwei alkylierfähigen Gruppen reagieren und dadurch zu Vernetzungen zwischen zwei Molekülen führen (114). So reagieren die AIC direkt mit den Nukleinsäuren im Sinne einer Verminderung der Nukleoproteinsynthese (122). Bierling (14, 15) berichtet über den Angriffspunkt des Trenimon^{R} am Nucleolus, dem Hauptsitz der RNS. Die Wirkung tritt bereits eine halbe Stunde nach Trenimon-Applikation ein. Dies wird als direkte oder indirekte Reaktion des Zytostatikums mit den Nukleoproteinen des Zellkernes gedeutet. Auch Domagk (45) spricht von einer direkten und primären Wirkung auf den Zellkern, der später Änderungen in der Zytoplasmastruktur folgen. Die Erklärung für die Wirkung alkylierender Substanzen, daß sie durch Brückenbildung zwischen zwei Makromolekülen die Kernteilung verhindern

sollen, ist zumindest für die AIC allein nicht ausreichend. Sie führen nämlich bei bestimmten Tiertumoren innerhalb der ersten zwei Tage zu Nekrosen, so daß man annehmen muß, daß neben der Kernteilung noch andere bedeutende Zellfunktionen unmittelbar betroffen sind, die man zum Teil zurückführen kann auf:

2. Schädigungen im Energiestoffwechsel

Tumorzellen unterscheiden sich von normalem Gewebe durch eine aerobe Glykolyse (129). Sie wird durch die AIC stark gehemmt (73, 105), hauptsächlich hervorgerufen durch eine Verminderung des Zellgehaltes an DPN (75, 76, 88, 106, 113, 120). Aber nicht nur die Senkung des DPN-Spiegels ist für die Hemmung der aeroben Glykolyse von Bedeutung, sondern zu einem kleinen Teil auch

3. die Schädigung verschiedener Fermente

Die AIC hemmen die Triosephosphat-Dehydrogenase (73) und die Hexokinase (108). Auch werden die Cholinesterase (32) und das Azetat - aktivierende Enzym (108) gehemmt, während die Ribonukleasen im Tumorzellkern aktiviert werden (70). Auf dem Wege der Alkylierung freier SH-Gruppen von Fermenten blockieren die Chinone ferner die Karboxylase (82, 83) und die Urease (109).

Nach mehreren Autoren (zitiert nach 53) sollen antimitotische Dosen von N-Lost eine Verminderung der Antikörperproduktion bewirken. Es kommt also unter der Behandlung mit dieser Substanz zu einer Abnahme der Immunität.
Müller (94) untersuchte im Tierversuch die Hemmung der Immunreaktion gegen menschliche Erythrozyten nach Gabe von Trenimon^{R} und anderen Zytostatika und fand einen hemmenden Effekt auf die Antikörperbildung.
Nach Zimmermann (37, 133, 134, 135) spielen insbesondere Nebennierenrindenhormone und ihr Zusammenwirken im Gesamtregulationsmechanismus des Endokriniums eine wesentliche Rolle. So ist seiner Meinung nach die Beziehung zwischen 17-Ketosteroiden als anaboler und Kortikosteroiden als kataboler Komponente bedeutungsvoll und der Untersuchung in relativ einfacher, aber doch spezifischer Weise zugänglich. Auf der anderen Seite konnte nachgewiesen werden, daß Funktionsänderungen im RES, insbesondere in bezug auf die Konjugation von Steroiden,

in den Nebennierenrindenhormonhaushalt eingreifen (77, 78, 111).
Daher erschien es interessant, die Wirkungen zweier in der Klinik gebräuchlicher Zytostatika in ihrer Wirkung auf die Nebennierenrinde zu untersuchen unter gleichzeitiger Berücksichtigung einer Funktionsänderung im RES.

MATERIAL UND METHODE

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 280 erbreine männliche Meerschweinchen vom Stamm "Pirbright - white" (Züchter : Karl Peters, Lauenau) mit einem Durchschnittsgewicht von 340 g verwendet. Die Nahrung bestand aus Preßfutter "altromin Ms" der Firma Altrogge, Lage/Lippe sowie zusätzlich aus Gras und Wasser je nach Bedarf. Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere mehrere Tage unter gleichbleibenden Bedingungen (Raumtemperatur, Nahrung) gehalten.
Da nach Schermer (118) die physiologischen Leukozytenzahlen beim Meerschweinchen bei 6 500 - 13 600 pro mm^3 liegen, wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn die weißen Blutelemente in der Thoma-Zählkammer jeweils doppelt bei der einen Hälfte der Tiere bestimmt und gleichzeitig ein Differentialblutbild angefertigt. Das erforderliche Blut wurde aus der Vena saphena an den Hinterläufen entnommen. Bei der anderen Hälfte der Tiere erfolgte unter Nembutalnarkose (2 mg/ 100 g Körpergewicht) die Splenektomie. 24 Stunden vor der Operation bekamen die Tiere weder Futter noch Wasser. Die Haare wurden im Operationsgebiet mit einem Depilatorium entfernt und die Bauchhaut im Bereiche der Linea alba durchtrennt. Die Milz wurde freigelegt, die zu- und abführenden Milzgefäße wurden unterbunden und das Organ entfernt. Nach Verschluß der Bauchdecken mit Catgut, wurde das Operationsgebiet antibiotisch versorgt und die Tiere für drei Tage in Einzelkäfige gesetzt. Drei Wochen nach komplikationslos verlaufener Operation wurden auch bei diesen Versuchstieren die Leukozyten wie oben angegeben bestimmt und je ein Differentialblutbild angelegt. Die Tiere wurden in insgesamt sechs Gruppen aufgeteilt :

Gruppe 1 : 50 Tiere für Trenimonbehandlung

Gruppe 2 : 50 Tiere für Endoxanbehandlung

Gruppe 3 : 40 Kontrolltiere

Gruppe 4 : 50 splenektomierte Tiere für Trenimonbehandlung

Gruppe 5 : 50 splenektomierte Tiere für Endoxanbehandlung

Gruppe 6 : 40 splenektomierte Kontrolltiere.

Im Vergleich mit der in der Literatur angegebenen Dosierung bei längerer Endoxan^{R}- und Trenimon^{R}-Gabe (67, 90, 91, 97) wurden unter laufender Gewichtskontrolle 10 mg/kg Körpergewicht Endoxan^{R} und 0,04 mg/kg Körpergewicht Trenimon^{R} intraperitoneal pro Tag appliziert. Die Versuche dauerten insgesamt 36 Tage. Nach jeweils vier Tagen wurden 4 behandelte und 4 Kontrolltiere aus jeder Gruppe dekapitiert und deren Blut gepoolt, um ausreichende Plasmamengen zu gewinnen. Wegen einer zu erwartenden Mortalität während der Versuchsdauer, wurden mehr Tiere als effektiv benötigt genommen. Die Auswahl der zu tötenden Tiere erfolgte nach der Methode der zufällig angeordneten Zahlen (38), die sich nach der Ziffer der Ohrmarken der einzelnen Tiere richteten. In dem durch Heparinisieren gewonnenen Plasma bestimmten wir die freien Corticosteroide nach der von Porter und Silber (102) angegebenen Methode sowie die Plasma - 17 - Ketosteroide mit der von Oertel und Kaiser modifizierten Methode nach Zimmermann (96). Gleichzeitig zählten wir die Leukozyten und fertigten ein Differentialblutbild pro Tier an.

Methode nach Porter- Silber zur Bestimmung der freien Corticosteroide:

Das Plasma wurde mit 3 x 2 Vol eiskaltem Methylenchlorid extrahiert. Nach Waschen des Methylenchlorids mit 5 ml 0,1 N NaOH und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen unter Stickstoff bis zur Trockne, ließen sich die Extrakte durch Verteilung zwischen 80 % Methanol und Hexan entfetten. Ein weiterer Reinigungsschritt ließ sich durch Verteilung zwischen Wasser und Benzol vornehmen. Die Farbreaktion erfolgte unter Verwendung von 0,054 % Phenylhydrazinhydrochlorid in 64 % Schwefelsäure über 40 Minuten im Wasserbad bei 60° C. Die quantitative Erfassung wurde im Eppendorf Photometer bei 405 mμvorgenommen.

Bestimmung der Plasma - 17 - Ketosteroide nach Zimmermann, modifiziert von Oertel und Kaiser:
Das präextrahierte Plasma wurde mit 5 Vol Äthanol: Aceton (1 : 1 v/v) gemischt, um das Eiweiß auszufällen.
Das Filtrat wurde nach Eindampfen mit 0,04 N Perchlorsäure in Äthylacetat versetzt und über 8 Stunden bei 40° C bebrütet. Nach der derartig erfolgten Spaltung der Konjugate wurde das Äthylacetat mit 1 N NaOH und H_2O gewaschen. Die Fette ließen sich anschließend durch Versetzen des über Na_2SO_4 getrockneten und eingedampften

Extraktes mit 70 % Methanol in der Tiefkühltruhe ausfrieren und durch Filtrieren entfernen. Das Methanol wurde unter Zugabe von Äthanol: Benzol 1 : 1 eingedampft.
Mit Chloroform-Methanol (1 : 1 v/v) wurde der Trockenrückstand quantitativ auf einen Konzentrierungsstreifen überführt. Steroide sowie 50 µg Testosteronstandard wurden durch aufsteigende Chromatographie mit Benzol-Methanol (9 : 1 v/v) in der Spitze des Konzentrierungsstreifens gesammelt. Die Spitze wurde abgeschnitten, in entsprechende Einschnitte des mit Propylenglykol-Methanol (1 : 1,25 v/v) imprägnierten Papierstreifens gesetzt und anschließend absteigend für 18 Stunden im Lösungsmittelsystem Propylenglykol / Methylcyclohexan chromatographiert. Die Dehydroepiandrosteron, Aetiocholanolon, Androsteron und "11 ß-Hydroxyaetiocholanolon" enthaltenden Abschnitte des getrockneten Papierchromatogramms wurden an Hand der R_T - Werte (relative Wanderungsgeschwindigkeit, bezogen auf Testosteron = 1) entsprechender Reinsubstanzen auf einem Standardstreifen (Dehydroepiandrosteron: 1,85, Androsteron: 3,30, Aetiocholanolon: 2,25 und "11 ß - Hydroxyaetiocholanolon": 0,17) festgelegt und mit Methanol eluiert. Gleichzeitig eluierten wir entsprechende Abschnitte eines Leerstreifens und gaben zu dem jeweiligen Eluat 10 µg der Reinverbindung als Standard für die Farbreaktion. Alle Eluate wurden unter Stickstoff zur Trockne eingedampft.
Trockenrückstände der Plasmafraktionen, der Papierleerextrakte + Standard sowie eines Papierleerextraktes wurden zur quantitativen Messung einer Mikromethode nach Zimmermann (132) unterworfen, indem die Rückstände in 0,2 ml 1 % m-Dinitrobenzol in abs. Äthanol gelöst, mit 0,1 ml 2,5 n Kalilauge in 90 % Äthanol versetzt und 60 Minuten lang bei 25° C unter Lichtausschluß gehalten wurden. Danach gaben wir 0,5 ml Wasser hinzu und extrahierten mit 1,0 ml Äther. Die Absorption des Ätherextraktes wurde bei 546 mµ im Spektralphotometer gegen den Papierleerextrakt gemessen.

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse geben die folgenden Abbildungen wieder.

Abb. 1 gibt die normale Schwankungsbreite der Porter-Silber-Chromogene der Kontrolltiere mit und ohne Splenektomie wieder.

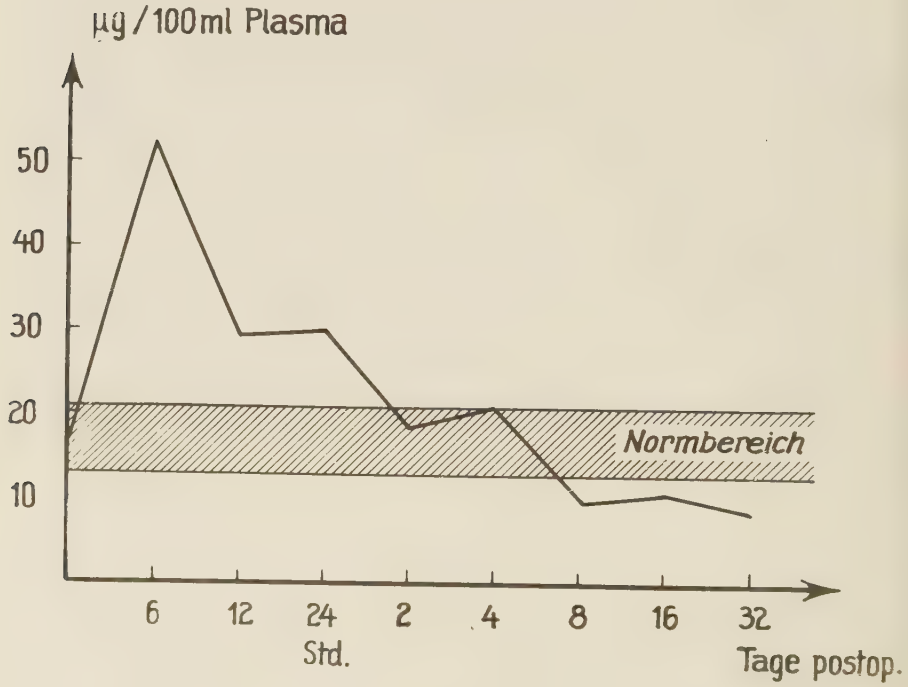


Abb. 1: Corticosteroide im Plasma (nach Porter und Silber) nach Splenektomie

Abb. 2 zeigt die quantitativen Veränderungen der Porter-Silber Chromogene nach Trenimongabe mit und ohne Splenektomie. Die physiologischen Werte der freien Corticosteroide liegen im Bereich von 13 - 21,5µg/100 ml Plasma. Am nichtsplenek-

tomierten Tier kommt es zu einem beträchtlichen Anstieg der Chromogene. Am 12. Tag wird die höchste Konzentration mit 72 µg/100 ml Plasma gemessen. Erst am 26. Tag nach Versuchsbeginn fällt die Kurve wieder in den Normbereich zurück. Die splenektomierten Tiere reagieren nach Trenimongabe nur mit einem kurzen initialen Anstieg der Porter-Silber Chromogene auf 38 µg/100 ml Plasma, dessen Maximum bereits am 8. Tag erreicht ist und am 16. Tag nach Beginn der Versuche wieder im physiologischen Schwankungsbereich liegt.

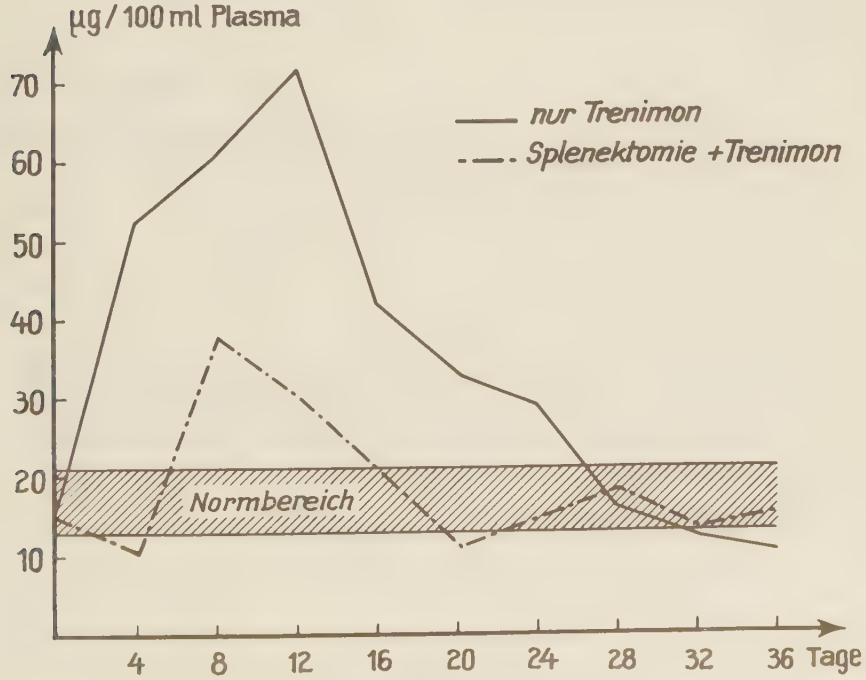


Abb. 2: Porter-Silber-Chromogene unter Trenimon

Unter Endoxan Medikation erkennt man in Abb. 3 beim nichtsplenektomierten Tier im Gegensatz zum Trenimon Tier nur geringe Abweichungen von der Norm. Nach Milzexstirpation zeigt sich ein vorübergehend etwas stärkerer Anstieg der Chromogene bis auf 40 µg/100 ml Plasma am 8. - 12. Tag.

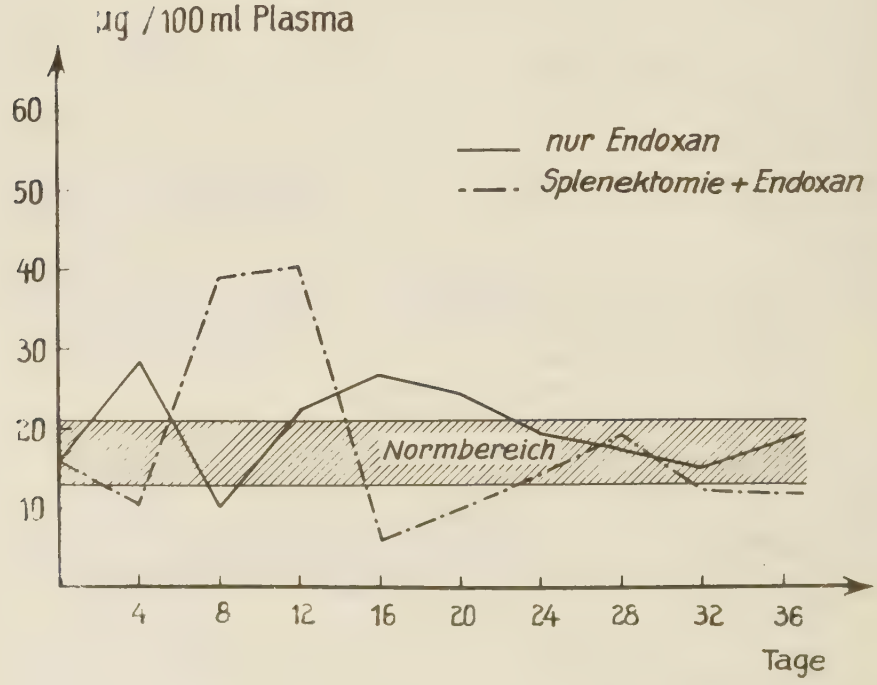


Abb. 3: Porter-Silber-Chromogene unter Endoxan

Entsprechend Abb. 1 zeigt die Abb. 4 den physiologischen Spielraum der 17-Ketosteroide im Plasma bei den Kontrolltieren mit und ohne Milz.

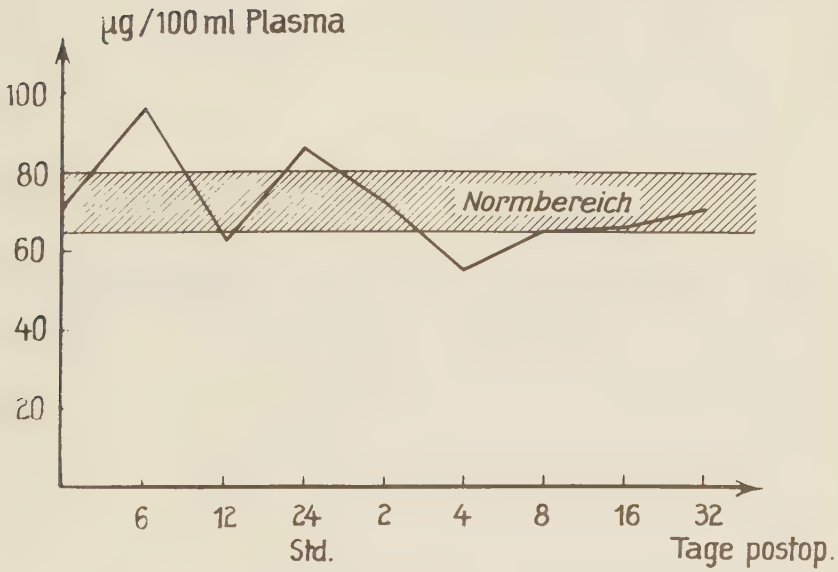


Abb. 4: 17- Ketosteroide im Plasma nach Splenektomie

Abb. 5 läßt die Verhältnisse der Plasma - 17 - Ketosteroide bei täglicher Trenimon Behandlung mit und ohne Milzentfernung deutlich werden. Am nichtsplenektomierten Tier liegen die Werte für die 17 - Ketosteroide vom 6. bis 19. Tag über dem Normalbereich mit einem Maximum am 8. - 12. Tag. Die Versuchstiere ohne Milz zeigen etwa vom 7. Tag an steigende Plasmakonzentrationen mit einem Kulminationspunkt am 12. Tag (135 µg/100 ml Plasma). Die Kurve bewegt sich dann langsam wieder auf den physiologischen Bereich zu, ohne ihn jedoch am 36. Tag nach Beginn der Untersuchungen zu erreichen.

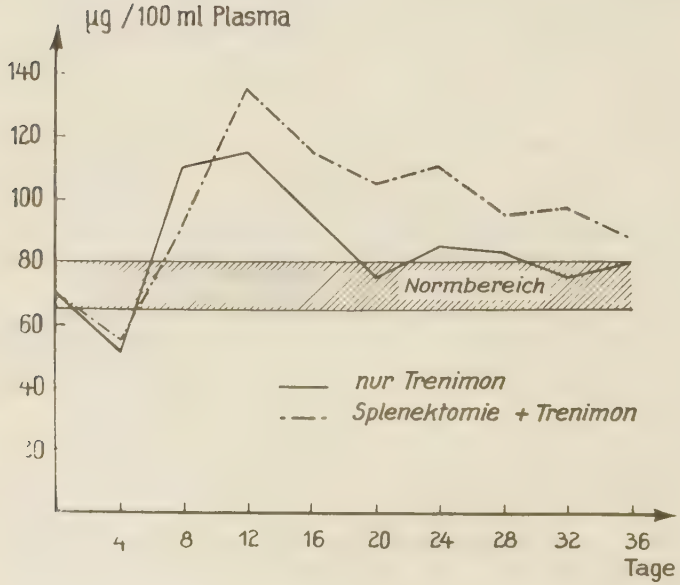


Abb. 5: 17 - Ketosteroide im Plasma unter Trenimon

Die Fraktion der 17 - Ketosteroide stellt Abb. 6 unter Endoxan beim normalen und milzlosen Meerschweinchen dar. Abgesehen von einem kurzen Anstieg der Hormone beim nichtsplenektomierten Tier am 8. Tag auf 98 µg/100 ml Plasma, fallen beide Kurven am 10. - 11. Tag unter den normalen Bereich bis zum Ende der Versuchsreihe ab.

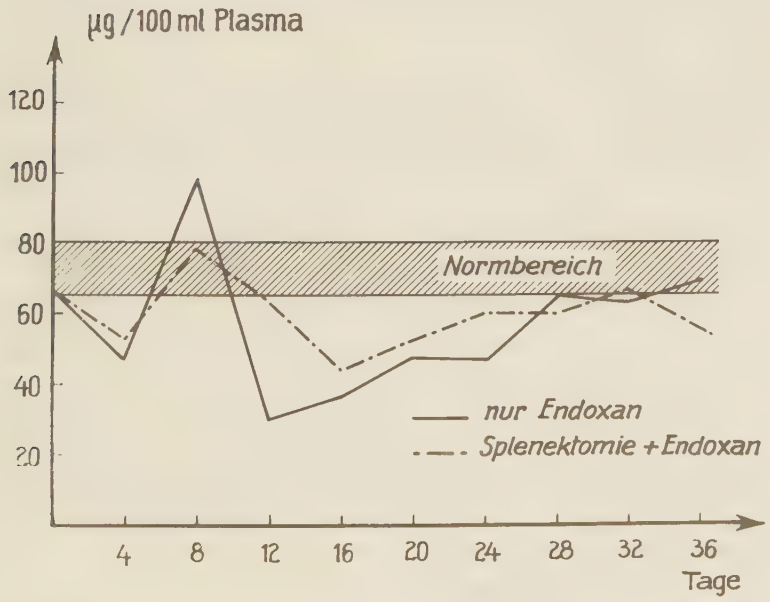


Abb. 6: 17 - Ketosteroide unter Endoxan

Während also unter Trenimon^{R} die 17 - Ketosteroide insbesondere nach Splenektomie über der Norm zu liegen kommen, ist unter Endoxan^{R} ein gegensätzliches Verhalten zu erkennen.

Die Bestimmung der Porter-Silber-Chromogene ergab nach alleiniger Applikation von Trenimon^{R} ohne Splenektomie einen deutlichen Anstieg über 24 Tage, der danach in einen Abfall der Chromogene übergeht. Nach Gabe von Endoxan^{R} stellte sich unter den gleichen Bedingungen nach anfänglichen relativ geringen Schwankungen im letzten Drittel der Versuche eine Normalisierung der Werte ein. Hingegen kehren beide Gruppen unter Trenimon^{R} - und Endoxan^{R}-Behandlung nach Splenektomie mit einem initialen Anstieg der freien Corticoide etwa am 16. Tag in den Normbereich zurück.

Die Gesamtleukozyten der Kontrolltiere hielten sich ohne erkennbare Tendenz zur Verminderung oder Vermehrung bei annähernd gleichbleibendem Verhältnis von granulierten (Eosinophile, Pseudoeosinophile) und mononukleären (Lymphozyten, Monozyten) Zellelementen in den schraffierten Bereichen der Abbildungen 7 - 10. Auffallend ist, daß die durchschnittlichen Leukozytenzahlen bei nichtsplenektomierten Tieren bei etwa 8.200/mm^3 (Trenimon^{R}) und 7.800/mm^3 (Endoxan^{R}) liegen, während die milzlosen Versuchstiere Ausgangswerte von 10.500/mm^3 (Trenimon^{R}) und 10.200/ mm^3 (Endoxan^{R}) aufweisen.

Unter dem Einfluß der zytostatischen Behandlung kommt es bei allen vier Gruppen zu einer deutlichen Leukozytendepression (Abb. 7 - 10). Der Abfall erfolgt schneller bei den splenektomierten Tieren, wie aus den Abb. 8 und 10 zu erkennen ist.

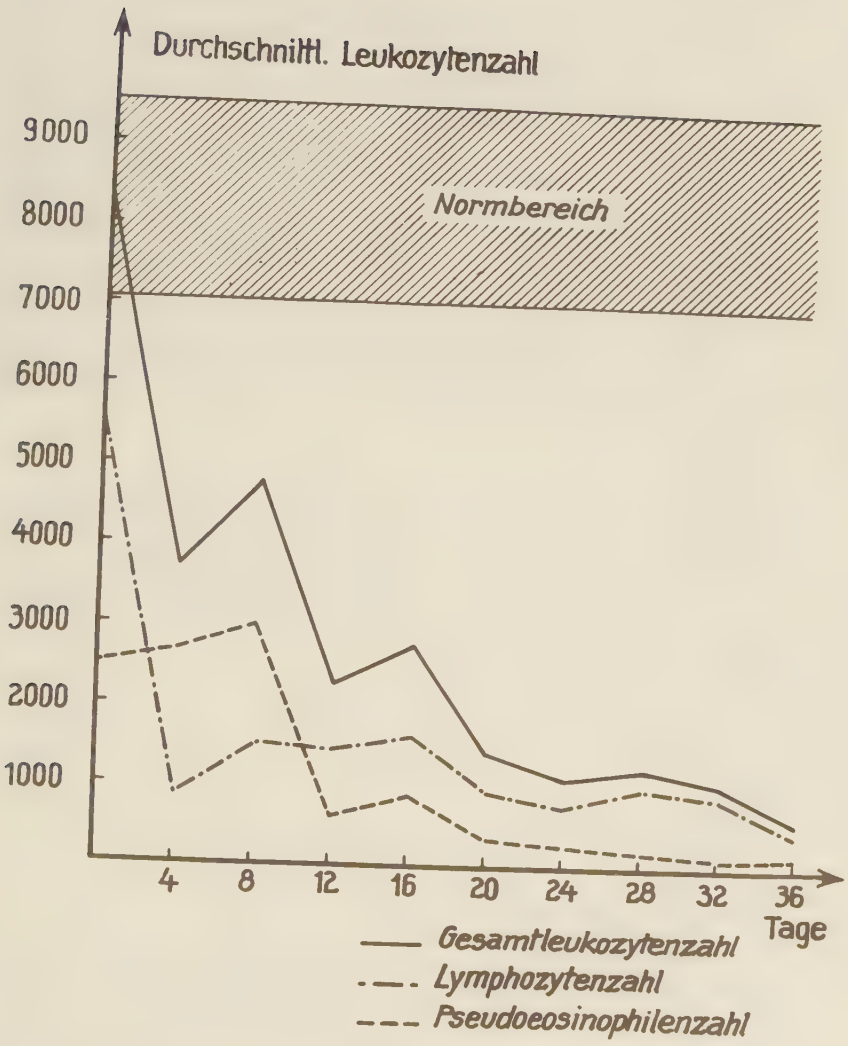


Abb. 7: Durchschnittl. Leukozytendepression beim normalen Meerschweinchen unter Trenimonbehandlung

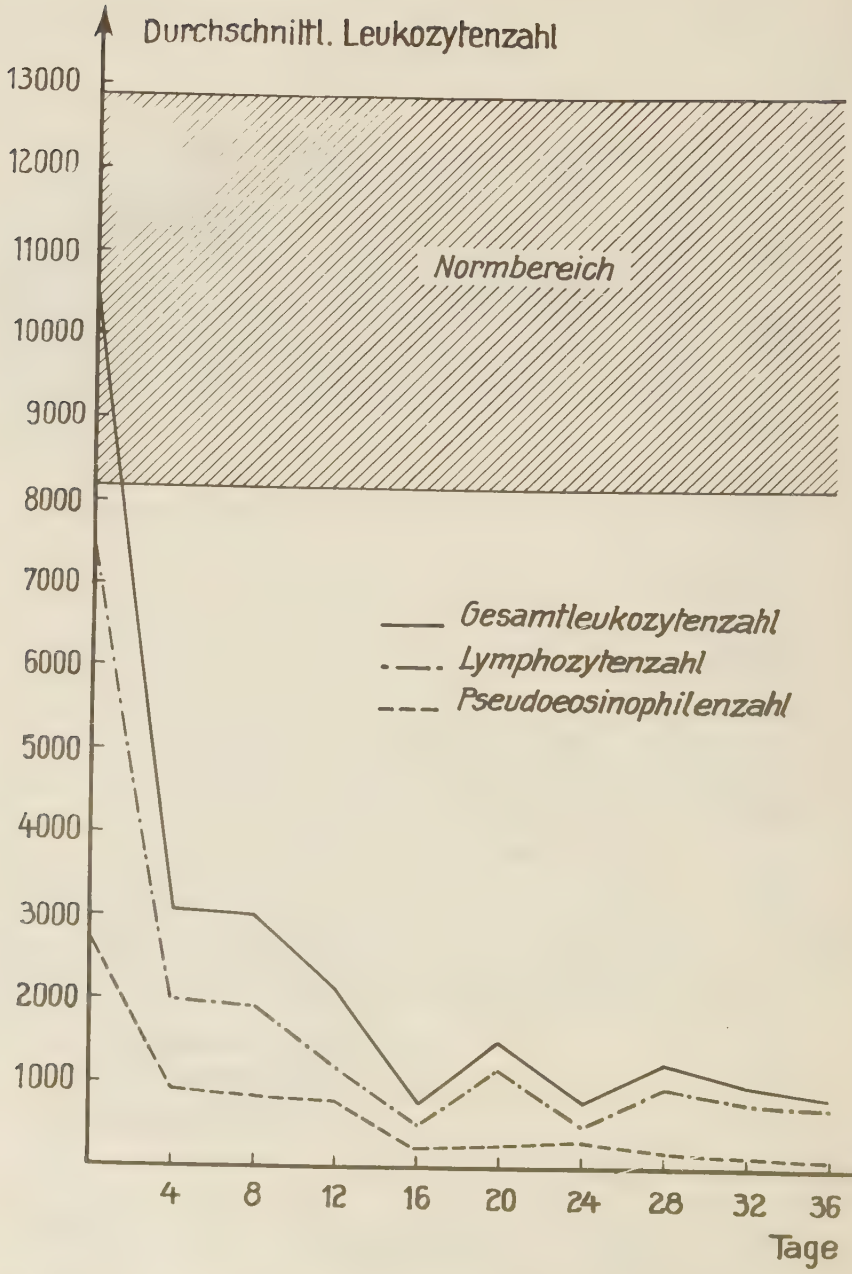


Abb. 8: Durchschnittl. Leukozytendepression beim splenektomierten Meerschweinchen unter Trenimonbehandlung

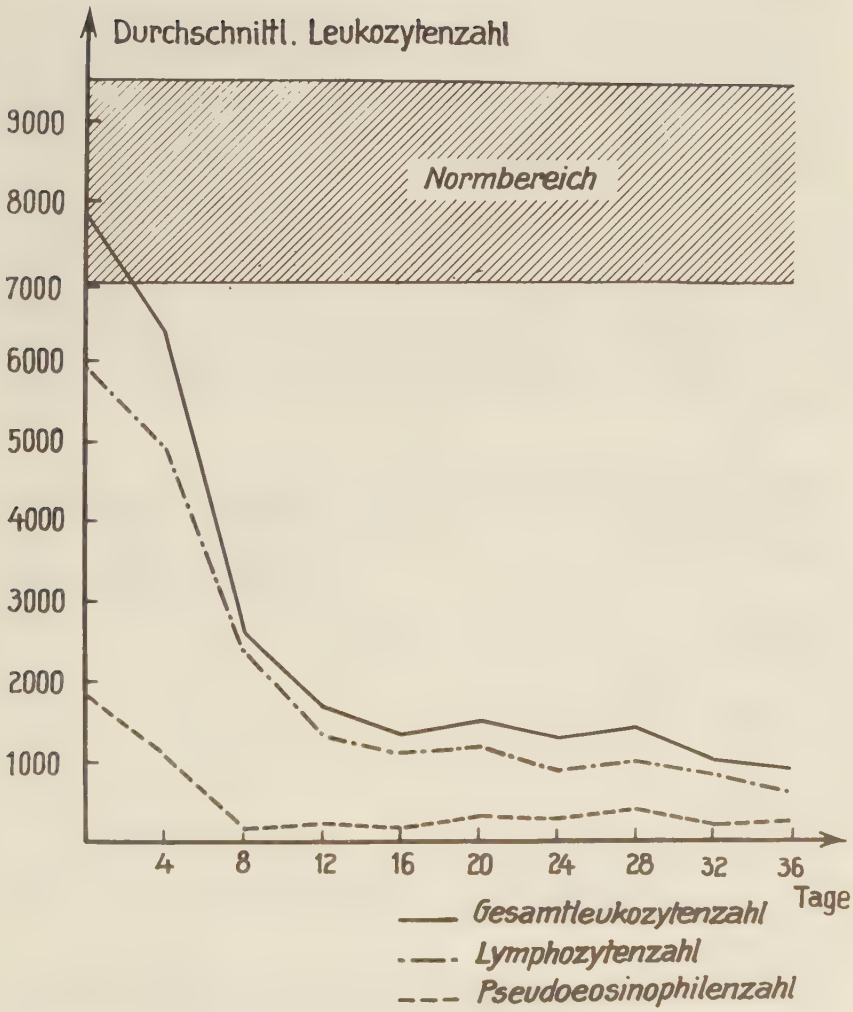


Abb. 9: Durchschnittl. Leukozytendepression beim normalen Meerschweinchen unter Endoxanbehandlung

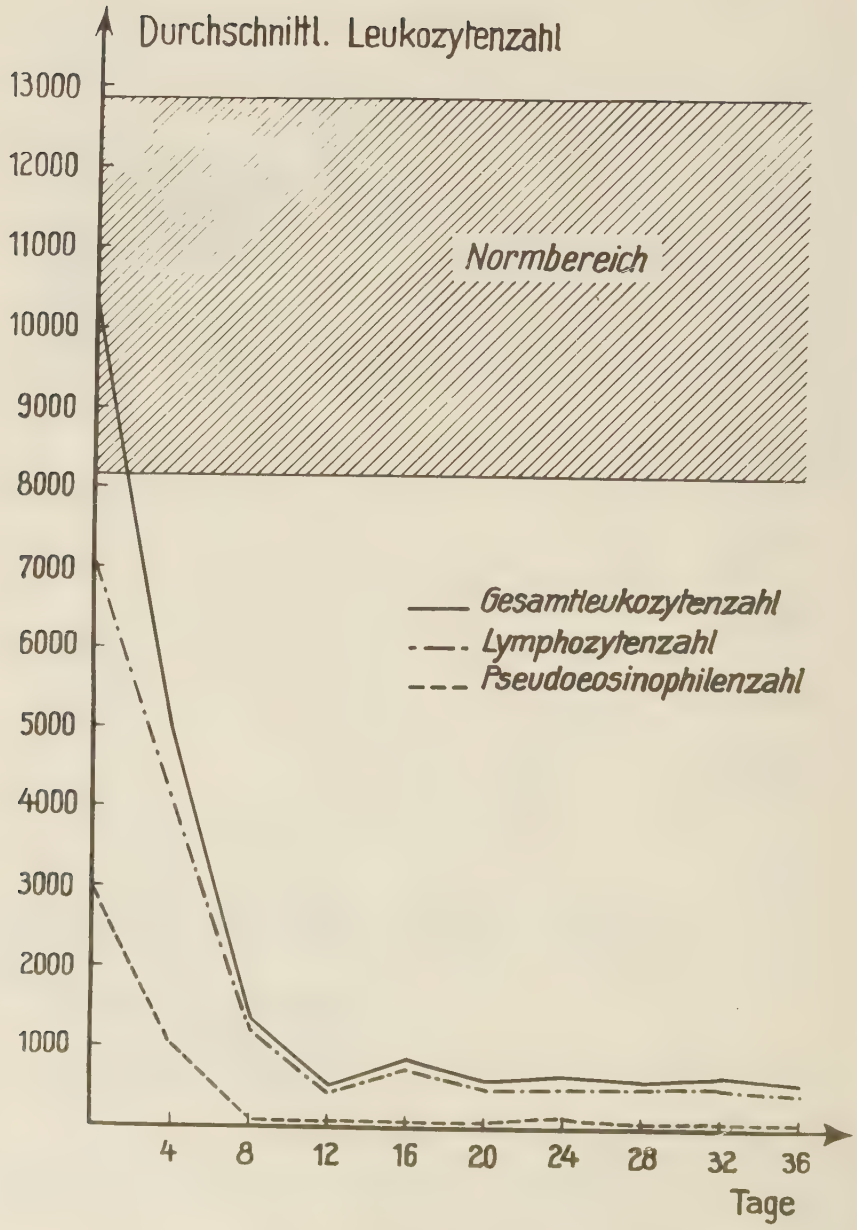


Abb. 10: Durchschnittl. Leukozytendepression beim splenektomierten Meerschweinchen unter Endoxanbehandlung

Über das Verhalten des Körpergewichtes unter zytostatischer Applikation geben die Abb. 11 und 12 Auskunft. Trenimon führt bei normalen und splenektomierten Meerschweinchen zu einer deutlichen Reduktion des Körpergewichtes.

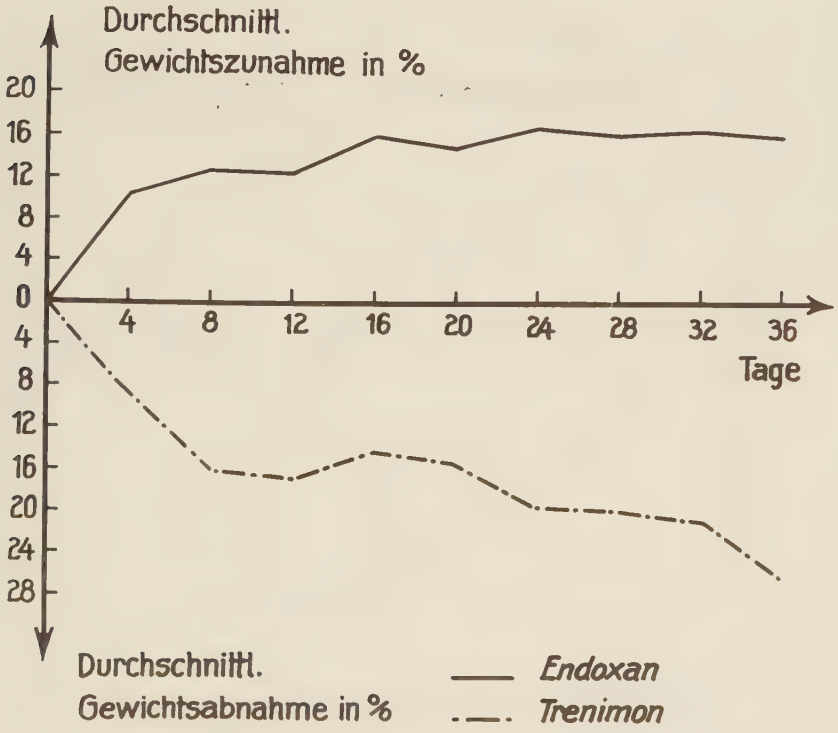


Abb. 11: Gewichtsveränderungen unter Trenimon- und Endoxanbehandlung beim nichtsplenektomierten Meerschweinchen

Bei Gabe von Endoxan tritt dieser Effekt bei milzlosen Tieren etwa am 20. Tage auf, während bei Tieren mit Milz nach einer anfänglichen Zunahme das Körpergewicht annähernd konstant bleibt.

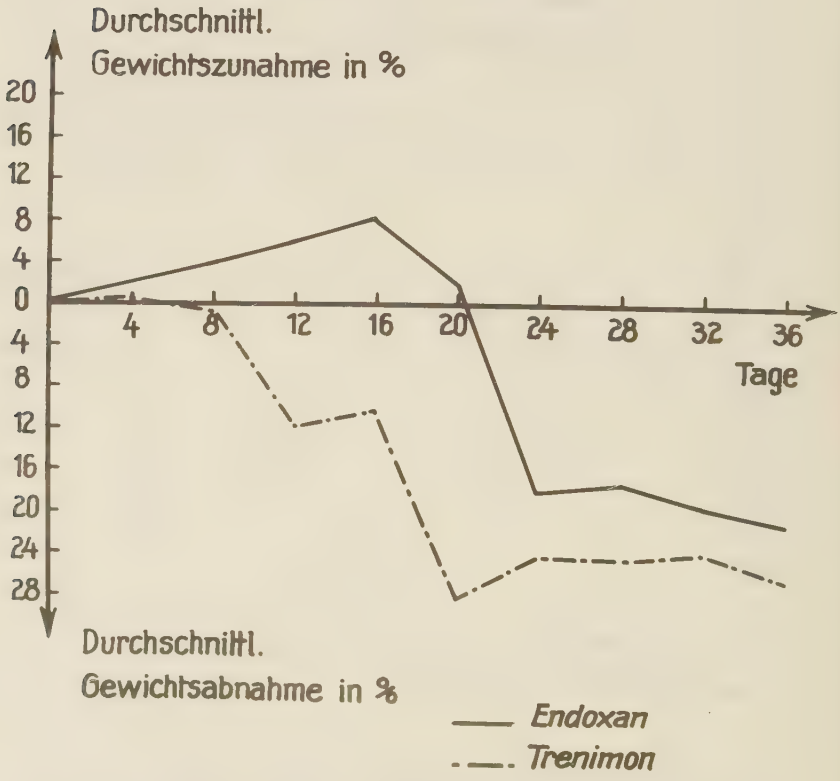
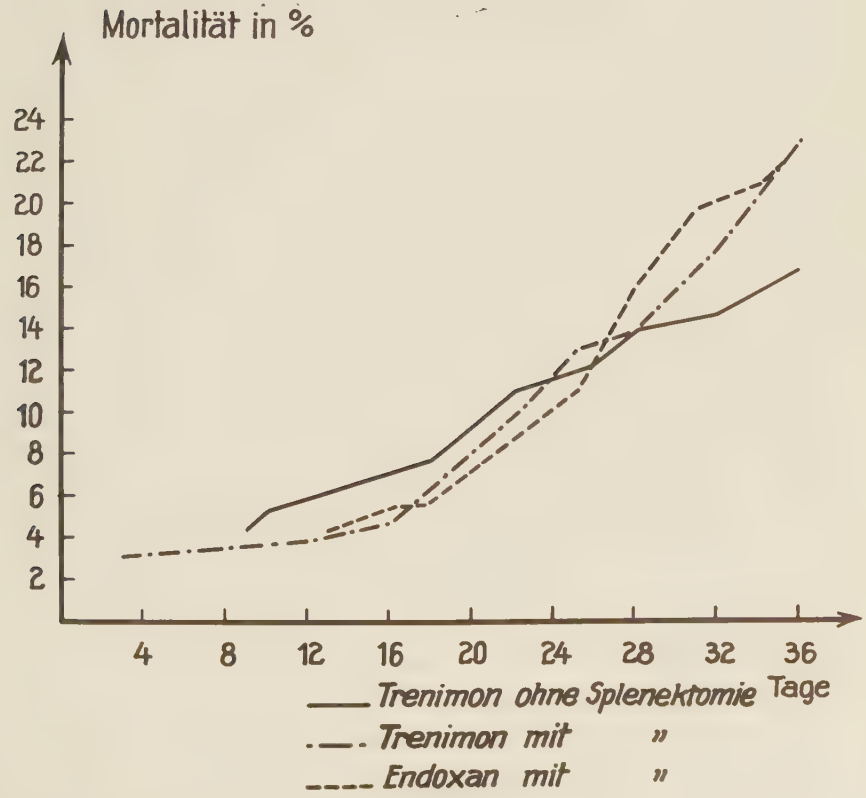


Abb. 12: Gewichtsveränderungen unter Trenimon- und Endoxanbehandlung beim splenektomierten Meerschweinchen

An Hand der Abb. 13 erkennt man, daß die Mortalität der Versuchstiere proportional der Dauer der zytostatischen Behandlung ansteigt. Bemerkenswert ist, daß von den Versuchstieren mit Milz keines unter Endoxangabe gestorben ist.



DISKUSSION

Den Anforderungen, die an derartige Versuche in bezug auf die Homogenität des Tiermaterials, der Haltung (Futter, Käfige) und der Ausschaltung störender Einflüsse gestellt werden, wurde, wie aus der Beschreibung der Methode zu entnehmen ist, nach Möglichkeit Rechnung getragen.
Hinsichtlich der Mortalität in den einzelnen Versuchsgruppen ist hervorzuheben, daß lediglich in der Gruppe der mit Endoxan^{R} behandelten nicht splenektomierten Meerschweinchen kein Tier verstorben ist, ein Umstand, der für eine protektive Wirkung der Milz gegenüber N-Lostderivaten spricht (131). Dies kommt auch zum Ausdruck, wenn man das Verhalten des Körpergewichts betrachtet, bei dem in dieser Gruppe nach leichter Zunahme eine Konstanz eintritt im Gegensatz zu den übrigen drei Gruppen, in denen die Tiere sämtlich an Gewicht verlieren.

Betrachtet man die Leukozytendepression, so zeigt sich, daß beide Präparate in gleicher Weise wirksam sind, ohne Unterschied, ob die Tiere eine Milz hatten oder nicht. Lediglich der Beginn der depressorischen Wirkung ist bei den splenektomierten Tieren rascher, was aber wahrscheinlich nicht auf die protektive Wirkung zurückzuführen sein wird, sondern in einem größeren Reservoir an weißen Blutkörperchen in den nicht splenektomierten Tieren begründet sein kann. Außerdem ist an eine größere Effektivität der zytostatischen Wirkung im kompensatorisch stimulierten Rest-RES zu denken. Eine derartige Stimulierung des Rest-RES nach Splenektomie konnte an Hand von Untersuchungen des weißen Blutbildes und der Plasma - sowie Harnsteroide herausgearbeitet werden. Geht man von der Annahme aus, daß die Existenz eines Milzhormons unwahrscheinlich ist, insbesondere in Hinsicht auf den Steroidhaushalt, so liegt es nahe, an eine Stimulierung des RES zu denken, wie dies etwa auch nach Gabe von Milzextrakten, die reichlich metabolisch aktive Stoffwechselprodukte aus dem Nukleinsäurehaushalt enthalten, außerdem nach Applikation von pyrogenen Reizstoffen zu beobachten ist. Die nach Splenektomie im Steroidhaushalt auftretenden Veränderungen drücken sich vornehmlich in einer Abnahme der freien Kortikosteroide aus.

Betrachtet man nun in Hinsicht auf diese Befunde die hier festgestellten Plasmasteroidwerte, so zeigt sich, daß die freien Corticosteroide, die anfänglich eine im Sinne der allgemeinen Reaktion auf Belastungen zu deutende Erhöhung aufweisen, eine Abnahme vermissen lassen.

Dagegen tritt bei den 17 - Ketosteroiden lediglich unter der Medikation von Trenimon^{R} eine Erhöhung des Plasmaspiegels ein. Die nach Gabe von Endoxan^{R} auftretende Erniedrigung der 17 - Ketosteroide im Plasma ist schwer zu deuten. Erstens wäre an eine zytostatische Wirkung, dies besonders unter Berücksichtigung des Energiestoffwechsels in der Nebenniere selbst, zu denken. Das erscheint aber unwahrscheinlich, wenn man die normalen Plasmaspiegel der Corticosteroide in Betracht zieht und könnte wohl nur mit Hilfe von Bebrütungsversuchen geklärt werden. Zweitens könnte eine mehr oder weniger spezifische Hemmung der adrenalen Sulfokinasen eine Rolle spielen, zumal man heute annimmt, daß die Biogenese adrenaler Androgene zum großen Teil in der Sulfatform vonstatten geht (112). Drittens wäre auch noch an einen zur zytostatischen Wirkung kompensatorischen Mehrverbrauch anaboler Androgene im blutbildenden System zu denken.

Im Zusammenhang betrachtet scheinen die ausbleibenden Veränderungen im Steroidhaushalt nach Splenektomie aber doch in einer verminderten Reaktionsfähigkeit im RES durch die zytostatische Wirkung begründet zu sein. Das Fehlen der Steroidveränderungen scheint indirekt ein Hinweis für die Richtigkeit der Annahme zu sein, daß diese Steroidveränderungen nach Splenektomie ihre Ursache in einem Mehrverbrauch freier Corticosteroide in der Peripherie haben. Hinsichtlich einer sicherlich vorhandenen Immunitätsminderung, lassen sich in keiner der vier Gruppen an Hand einer möglichen Dissoziation anaboler und kataboler Steroide, wie das von Zimmermann verschiedentlich postuliert wurde (37, 135), Rückschlüsse ziehen.

Neben der hier besonders interessierenden Verhaltensweise des auf der einen Seite stimulierten, auf der anderen Seite gehemmten RES, geben die angeführten Resultate Aufschluß über die Effektivität und Verträglichkeit experimenteller Leukozytendepression beim Meerschweinchen. Bei der gewählten Dosierung, die den Angaben in der Literatur entspricht, scheint unter Berücksichtigung der Mortalität,

des Gewichtsverhaltens, der Veränderungen im Steroidhaushalt und nicht zuletzt der deutlichen Verminderung der Leukozyten Endoxan^{R} besser verträglich zu sein.

ZUSAMMENFASSUNG

An 280 erbreinen männlichen Meerschweinchen wurde die Wirkung zweier Zytostatika auf Blutbild und Plasmasteroide untersucht. Es ließ sich bei der gewählten Dosierung eine deutliche Leukozytendepression feststellen.
Die Veränderungen im Steroidhaushalt, wie sie nach Splenektomie auftraten, konnten durch die Zytostatika aufgehoben werden.

VERZEICHNIS DES SCHRIFTTUMS

(1)	Alexander, P., Fox, M., Stacey, K.A., Smith, L.F	Biochem. J. 52, 177 (1952)
(2)	Alexander, P., Stacey, K.A.	Ann. N.Y. Acad. Sci. 68, 1225 (1958)
(3)	Aleksandrowicz, J.	Polski : Tygodnik Lekarski : 7, 917 (1952)
(4)	Arnold, H., Bourseaux, F., Brock, N.	Naturwissenschaften 3, 64 (1958)
(5)	Arnold, H., Bourseaux, F., Brock, N.	Naturwissenschaften 45, 64 (1958)
(6)	Arnold, H., Bourseaux, F., Brock, N.	Nature 181, 931 (1958)
(7)	Arnold, H., Bourseaux, F.	Angew. Chemie 70, 539 (1958)
(8)	Arnold, H.	In: Chemotherapie maligner Tumoren. 2. Bielefelder Symposion 1959 Schattauer - Verlag, Stuttgart
(9)	Arnold, H., Bourseaux, F., Brock, N.	Arzneim.-Forsch. 11, 143 (1961)
(10)	Auerbach, C., Robson, J.M., Carr, J.G.	Science 105, 243 (1947)
(11)	Berenblum, I.	J. Path. Bact. 34, 731 (1931)
(12)	Bergel, F.	Ann. N.Y. Acad. Sci. 68, 1238 (1958)
(13)	Betz, Meier et a.	Zitiert nach (53)

(14)	Bierling, R.	Verh. d. dtsch. Ges. f. Path., 41. Tagg. (1957)
(15)	Bierling, R.	Chemotherapeut. Probleme maligner Tumoren, 2. Symposium, Enke, Stuttgart (1960)
(16)	Bodenstein, D.	J. cell. a. compar. Physiol. 43, Suppl. 1, 179 (1954)
(17)	Bolt, W., Ritzl, F., Toussaint, R., Nahrmann, H.	Arzneim.-Forsch. 2, 170 (1961)
(18)	Bolt, W., Ritzl, F., Toussaint, R., Nahrmann, H.	Arzneim.-Forsch. 11, 170 (1961)
(19)	Borison, H.L.	Am. J. Physiol. 192, 410 (1958)
(20)	Boyland, Fleischhacker et a.	Zitiert nach (53)
(21)	Brandt, H.v., Höhne, G.	Naturwissenschaften 39, 283 (1952)
(22)	Brin, M., McKee, R.W.	Arch. Biochem. Biophys. (N.Y.) 61, 384 (1956)
(23)	Brock, N.	Zschr. Krebsforschung 62, 9 (1957)
(24)	Brock, N.	Arzneim. - Forsch. 8, 1 (1958)
(25)	Brock, N. Wilmanns, H.	Dtsch. Med. Wschr. 83, 453 (1958)
(26)	Brock, N.	Méd. et Hyg. (Genf) 17, 480 (1959)
(27)	Brock, N.	Sd. Band. Strahlenther. 41 / III, 347 (1959)
(28)	Brock, N. Hohorst, H.J.	Naturwissenschaften 49, 610 (1962)

(29)	Brock, N.	2. Internationales Symposium f. Chemotherapie Neapel 1961, III (1963): 45 - 68
(30)	Brock, N., Hohorst, H.J.	Arzneim. - Forsch. 13, 1021 (1963)
(31)	Bucher, O.	Histologie u. mikroskop. Anatomie des Menschen 4. Auflage S. 57 (1962) Medizin. Verlag H. Huber, Bern und Stuttgart
(32)	Bullock, K.	Biochem. Z. 63, 485 (1956)
(33)	Cardinali, G., Caprino, G., Piscitelli, N.	Tumori (Milano) 40, 176 (1954)
(34)	Coggins, R.P., Ravdin, G.R., Eisman, S.	Canc. Chemother. Rep. 3, 9 (1959)
(35)	Colter et a.	zitiert nach (91) und (118)
(36)	Darlington, C.D.	Heredity 1, 187 (1947)
(37)	Diehl, K., Nitsch, W., Rindt, W., Zimmermann, W.	Z. ges. experim. Med. 140, 158 (1966)
(38)	Documenta Geigy	Wissenschaftl. Tabellen 6. Aufl., 131 (1962)
(39)	Domagk, G., Petersen, S., Gauß, W.	Z. Krebsforsch. 59, 617 (1954)
(40)	Domagk, G.	Dtsch. Med. Wschr. 21, 801 (1956)
(41)	Domagk, G.	Dtsch. Med. Wschr. 81, 801 (1956)
(42)	Domagk, G., Wolf, H., Gerlich, U.	Med. Klinik 52, 799 (1957)
(43)	Domagk, G.	Münch. med. Wschr. 100, 16 (1958)

(44)	Domagk, G.	Der Krebsarzt 13, 2 (1958)
(45)	Domagk, G.	Verh. Dtsch. Ges. Path., 38. Tagg. S 338 München; in: Chemotherapeut. Probleme maligner Tumoren, S. 7 Stuttgart (1960)
(46)	Droste, R., Dorszewski, E., Koch, E.	Ärztl. Forschg. 13, 1 (1959)
(47)	Druckrey, H., Raabe, S.	Klin. Wschr. 30, 882 (1952)
(48)	Druckrey, H.	Acta Unio Intern. Cancr. 15, 85 (1959)
(49)	Druckrey, H., Steinhoff, D., Nakayama, M., Preussmann, R., Anger, K.	Dtsch. Med. Wschr. 88, 1 (1963)
(50)	Eger, W., Kallenbach, H.-H., Schattenfroh, C.	Strahlentherapie 119, 132 (1962)
(51)	Fassbender, D.J.J.	Inauguraldissertation, Hamburg (1961)
(52)	Foley, G.E., Friedman, O.M., Drolet, B.P.	Cancer. Res. 21, 57 (1961)
(53)	Gaertner, H.	Z.ges. inn. Med. 12, 426 (1957)
(54)	Gauß, W., Petersen, S.	Angew. Chem. 69, 252 (1957)
(55)	Gerhards, E., Lutzmann, L.	Klin. Wschr. 39, 1253 (1961)
(56)	Gerhartz, H.	Ver. dtsch. Ges. inn. Med. 60, 919 (1954)
(57)	Gerhartz, H.	Strahlentherapie Sbd. 37, 285 (1957)
(58)	Gerhartz, H.	Berl. Med. 10, 27 (1959)

(59)	Gerhartz, H.	Ärztl. Wschr. 14, 255 (1959)
(60)	Gerhartz, H.	Blut, Bd 5, 360 (1959)
(61)	Gilman, A., Philips, F.S.	Science 103, 409 (1946)
(62)	Goldacre, R.J., Loveless, A., Ross, W.C.J.	Nature 163, 667 (1949)
(63)	Goodman, L.S., Wintrobe, M.M., Damechek, W., Goodman, M.I., Gilman, A., Lennan, M.T.M.	J. Am. Med. Ass. 132, 126 (1946)
(64)	Grella, P.	Arch. It. Pat. Clin. Tum. 6, 131 (1963)
(65)	Grundmann, E., Kröger, H., Holzer, H.	Klin. Wschr. 38, 546 (1960)
(66)	Hebborn, P., Danielli, F.J.	Nature 177, 25 (1956)
(67)	Hecht, G., Gloxhuber, Chr.	Sonderdruck aus: Medizin u. Chemie Bd. 7 (1963)
(68)	Henke, H., Höhne, G., Künkel, H.A.	Z. Krebsf. 62, 347 (1958)
(69)	Henne, H.F.	Arch. Klin. Chir. 297, 128 (1961)
(70)	Hilz, H., Klempien, E.J.	Biochem. Z. 331, 563 (1959)
(71)	Höhne, G., Heinrich, H.L., Schubert, G.	Arch. Gyn. 190, 207 (1958)

(72)	Höhne, G., Bertram, C., Schubert, G.	Acta Union internat. contre le cancer 16, 658 (1960)
(73)	Holzer, H., Sedlmayr, G., Kemnitz, A.	Biochem. Z. 328, 163 (1956)
(74)	Holzer, H., Kröger, H.	Klin. Wschr. 36, 677 (1958)
(75)	Holzer, H., Gloger, P., Sedlmayr, G.	Biochem. Z. 330, 59 (1958)
(76)	Holzer, H., Boltze, H.J.	Z. Krebsforsch. 64, 113 (1961)
(77)	Kaiser, E., Rindt, W.	Klin. Wschr. 42, 646 (1964)
(78)	Kaiser, E., Rindt, W.	Dtsch. med. Forsch. 2, 163 (1964)
(79)	Kleibel, F.	Med. Welt 43, 2282 (1962)
(80)	Koller, P.C., Veronesi, U.	Brit. J. Cancer 10, 703 (1956)
(81)	Koller, P.C.	Ann. N.Y. Acad. Sci. 68, 783 (1958)
(82)	Kuhn, R., Beinert, H.	Berichte d.Dtsch.Chem. Ges. 76, 904 (1943)
(83)	Kuhn, R., Beinert, H.	Berichte d.Dtsch.Chem. Ges. 80, 101 (1947)
(84)	Lehmann, F.E., Hadorn, H.	Helv. physiol.pharm. Acta 4, 11 (1946)
(85)	Le Page, G.A., Henderson, J.F.	Progr. exp. Tum. Res. 1, 440 (1960)
(86)	Linke, A., Freudenberger, B.	Symposien aktueller therapeut. Probleme 3. Heft, 38 (1960)

(87)	Liss, E., Palme, G.	Naturwiss. 50, 336 (1963)
(88)	Löhr, G.W.	Klin. Wschr. 35, 1163 (1957)
(89)	Löhr, G.W.	Chemoth. maligner Tum. 2. Bielefelder Symposium (1959)
(90)	Lutzmann, L., Deppe, H.D.	Z. Hyg. Infektionskr. 148, 458 (1962)
(91)	Maguire, H., Steers, E., Maibach, H.	Fed. Proc. 21, 24 (1962)
(92)	Meyer, V.	Ber. 20, 1729 (1887)
(93)	Miller, Z.	Arch. Biochem. Biophys. (N.Y.) 47, 137 (1953)
(94)	Müller, U.	Inauguraldiss., Homburg-Saar (1966)
(95)	Mutolo, V., Abrignani, F.	Oncologia 7, 61 (1954)
(96)	Oertel, G.W., Kaiser, E.	Clin. chim. Acta 7, 221 (1962)
(97)	Pallotta, A.J., Rall, D., Ward, J.	Proc. Amer. Ass. Canc. Res. 3, 140 (1960)
(98)	Palme, G., Liss, E.	Klin. Wschr. 41, 291 (1963)
(99)	Palme, G., Liss, E., Oeff, K., Platis, A.	Arzneim. - Forsch. 13, 1034 (1963)
(100)	Petersen, S., Gauß, W., Urbschat, E.	Angew. Chem. 67, 217 (1955)
(101)	Pliess, G.	Frankfurt. Z. Path. 69, 437 (1958)

(102)	Porter, C.C., Silber, R.H.	J. biol. Chem. 185, 201 (1952)
(103)	Preussmann, R.	Arzneim. - Forsch. 8, 9 (1958)
(104)	Preussmann, R.	Arzneim. - Forsch. 8, 638 (1958)
(105)	Pütter, J.	Verh. d. dtsch. Ges. f. Path. 41. Tagg., 374 (1957)
(106)	Pütter, J.	Chemotherapeut. Probleme maligner Tum., 2. Symposium, Enke-Verlag, Stuttgart (1960)
(107)	Pütter, J.	Therap. Ber. 32, 255 (1960)
(108)	Pütter, J.	Arzneim. - Forsch. 10, 8 (1960)
(109)	Quastel, J.H.	Biochem. Journ. 27, 1116 (1933)
(110)	Rathgen, G.H., Humke, W., Heinrichs, H.	Chemother. 7, 33 (1963)
(111)	Rindt, W., Kaiser, E., Zimmermann, W.	Acta hepato-splenol. 2, 99 (1965)
(112)	Rindt, W., Oertel, G.W.	13. Symp. d. dtsch. Ges. Endokrinologie, Würzburg (1967)
(113)	Roitt, J.M	Biochem. J. 63, 300 (1956)
(114)	Rose, J.L., Hendry, J.A., Walpole, A.L.	Nature 165, 993 (1950)
(115)	Ross, W.C.J.	Advances in Cancer Res. 1, 397 (1953)
(116)	Ross, W.C.J.	Ann. N.Y. Acad. Sc. 68, 669 (1958)
(117)	Scaltrini, G.C., Tognella, S., Conigliaro, S., Grifoni, V.	Haemat. lat. 4, 411 (1961)

(118)	Schermer, S.	Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. J.A. Barth, Leipzig (1954)
(119)	Scheuer-Karpin, R.	Z. ärztl. Fortbildg. 50, 978 (1956)
(120)	Schmid, G.G.	Klin. Wschr. 37, 91 (1959)
(121)	Schmidt, L., Schennetten, F.	Z. ges. inn. Med. 11, 477 (1956)
(122)	Scholtissek, G.	Z. Krebsforsch. 62, 109 (1957)
(123)	Sellei, C., Antalóczy; Z.	Wiener-Z. inn. Med. 37, 337 (1956)
(124)	Sternberg, St., Philips, F.S., Scholler, J.	Ann. N.Y. Acad. Sci 68, 811 (1958)
(125)	Stötter, G.	Wiener Med. Wschr. 34, 539 (1961)
(126)	Sugiura, K., Schmid, F., Schmid, M.	Proc. Americ. Assoc. Cancer Res. 3, 271 (1961)
(127)	Suppan, A.	Krebsarzt 19, 97 (1964)
(128)	Trams, E.G., Klopp, C.T.	Cancer Res. 15, 617 (1955)
(129)	Warburg, O.	Über den Stoffwechsel der Tumoren, Springer-Verlag, Berlin (1926)
(130)	Wheeler, G.P., Skipper, H.E.	Arch. Biochem Biophys. (N.Y.) 72, 465 (1957)
(131)	White, P.	Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3, 73 (1959)
(132)	Zimmermann, W.	Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 233, 257 (1935)
(133)	Zimmermann, W.	Arzneim. - Forsch. 5, 493 (1955)
(134)	Zimmermann, W.	Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 167, 140 (1956)
(135)	Zimmermann, W.	Med. Mschr. 2, 103 (1959)

Herrn Prof. Dr. Dr. Dipl. chem.W. Zimmermann danke ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. E. Kaiser und Dr. W. Rindt danke ich für die Einführung in die Methodik und für anregende Diskussionen.

LEBENSLAUF

Am 4. Januar 1940 wurde ich als Sohn des Bundesbahn-Amtmannes Hermann Waider und seiner Ehefrau Herta, geb. Walter in Oberhausen geboren.
Von 1946 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Oberhausen und anschliessend dort das Staatliche-Neusprachliche Gymnasium, auf dem ich am 3. März 1960 die Reifeprüfung ablegte.
Am 6. April 1960 schrieb ich mich in der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln ein und bestand dort nach zwei Semestern am 26. April 1961 die naturwissenschaftliche Vorprüfung. Nach einem weiteren Semester in Köln setzte ich das Studium an der Universität Saarbrücken fort, an der ich am 11. April 1963 die ärztliche Vorprüfung bestand. Nach dem 1. klinischen Semester an der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln studierte ich vom 2. bis 6. klinischen Semester wieder an der Universität des Saarlandes, wo ich am 29. Juli 1966 mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen abschloß.

Vom 1. Oktober 1966 bis zum 31. März 1967 war ich im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes in Homburg tätig. Seit dem 1. April 1967 bin ich im 26 th Tactical Hospital auf dem amerikanischen Flugplatz Ramstein beschäftigt.

ROTAPRINT-OFFSETDRUCKEREI

Klein

6602 Dudweiler · Scheidter Straße 26
Telefon Sulzbach 7 32 84
Drucksachen aller Art · Fotokopien
Spezialgebiet: Druck v. Dissertationen